

Septik Ratlarda Metilen Mavisinin Akciğer Hasarı Üzerine Etkileri

Semra Demirbilek*, E. Ebru Sızanlı*, Abdurahman Karaman**, Neşe Karadağ***, Nihayet Bayraktar****, Emine Türkmen***, M.Özcan Ersoy*

*İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Anesteziyoloji ve Reanimasyon AD, Malatya

**İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Cerrahisi AD, Malatya

***İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji AD, Malatya

****İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya AD, Malatya

Amaç: Sepsisin farklı fazlarında, akciğer dokusundaki nitrik oksit (NO) üretimi, antioksidan kapasite ve lipid peroksidasyonu üzerine metilen mavisinin (MM) etkileri rat sepsis modelinde araştırıldı.

Gereç ve Yöntem: 200-230 g, Sprague Dawley cinsi 60 rat rastgele 3 gruba (n=20) ayrıldı: 1. grup, kontrol grubu (grup K); 2. grup, sepsis (grup S); 3. grup, sepsis+MM 25mg/kg intraperitoneal (grup MMS). Sepsis, çekal ligasyon ve delme metodu ile oluşturuldu. Her grup rasgele 10 rattan oluşan iki alt gruba ayrıldı. Erken sepsis grubu cerrahi prosedürden 9 s, geç sepsis grubu 18 s sonra sakrifiye edildi. Akciğer dokusunda süperoksid dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutasyon peroksidaz (GSH-Px), malondialdehid (MDA) ve total nitrit+nitrat (NOx) düzeyleri ölçüldü. Akciğer doku kesitleri 1-4 arası doku hasar skorlamasına göre histopatolojik olarak değerlendirildi.

Bulgular: Grup MMS'de, CAT düzeyi erken ve geç sepsis döneminde, SOD ve GSH-Px düzeyi ise sadece erken sepsis döneminde grup S'ye göre anlamlı olarak arttı. MM, hem erken hem de geç sepsis dönemlerinde NOx ve MDA düzeylerini grup S'ye göre anlamlı olarak azalttı (p<0.05). Histopatolojik incelemede grup S'de interstisyel alanda belirgin iltihabi infiltrasyon artışı ve alveolar septalarda kalınlaşma görülürken, grup MMS'de daha az alveolar hasar mevcuttu.

Sonuç: MM'nin, NO sentezini azaltıcı etkisinin yanısıra SOD, KAT ve GSH-Px düzeylerini arttırarak lipid peroksidasyonunu önlediği ve böylece erken sepsis fazında daha belirgin olmak üzere akciğer hasarını azalttığı saptandı.

Anahtar Kelimeler: MODS, Akciğer hasarı, ARDS, Metilen mavisi, Oksidatif stres

The Effects of Methylene Blue on Lung Injury in Septic Rats

Aim: The aim of this study is to investigate the effects of methylene blue (MB) on NO production, antioxidant status and lipid peroxidation in lung injury during the different stages of sepsis in rats.

Material and methods: Sixty Sprague Dawley rats weighing 200-230 g, were randomly divided into 3 groups. The rats of the first group were sham operated (control, group C); the second group, sepsis (group S); the third group received MB (25mg/kg, i.p.), MBS (sepsis+MB). Sepsis was induced by caecal ligation and puncture method. Each group was randomly subdivided into two subgroups (early and late sepsis) consisting of 10 rats which were sacrificed at 9 or 18 h after surgical procedure. In the lung tissue, total nitrite/nitrate (NOX), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathion peroxidase (GSH-PX) and malondialdehyde (MDA) levels were measured. Damage to the lung tissue was graded by a pathologist on a scale of 1 (best) to 4 (worst).

Results: In group MBS, CAT levels increased significantly both in early and late sepsis groups, whereas, SOD and GSH-PX levels increased significantly only in early sepsis groups compared to group S. Methylene blue, significantly decreased NOx and MDA levels in both early and late sepsis groups compared to group S (p<0.05). Group S showed a marked increase of inflammatory inflammation into the interstisyel space and thickening of the alveolar septa, whereas the alveolar damage score was lower in the MBS groups.

Conclusion: Besides decreasing the NO synthesis, MB also increased SOD, CAT and GSH-Px levels and thereby lipid peroxidation was prevented and lung injury was significantly decreased especially during early sepsis.

Key Words: MODS, Lung injury, ARDS, Methylene blue, Oxidative stress.

Endotoksin, sepsiste inflamatuvar mediatörlerin salınımına ve aktivasyonuna neden olur. Gelişen sistemik inflamatuvar yanıt sendromu akut akciğer hasarı (ALI) ve/veya akut solunum yetmezliği sendromu ile (ARDS) ilişkilidir. Akciğer hasarı patofizyolojisinde, antioksidan savunma sisteminin olmamasının veya aşırı oksidan üretimi sonucu antioksidan savunmanın yetersiz kalmasının rol oynadığı düşünülmektedir.^{1,2} Bu oksidatif mekanizmalarla savaşan ve organizmayı oksidatif hasara karşı koruyan biyolojik savunma sistemleri vardır. Bunlardan başlıcaları, superoksid dismutaz (SOD), katalaz (KAT) ve glutatyon peroksidazdır (GSH-PX).^{3,4}

Metilen mavisi (MM) yıllardır klinik kullanımda olan, toksisitesi düşük, kolay ulaşılabilir bir ajandır. Ksantiz oksidaz (XO) tarafından elektron transferinde kullanılan moleküler oksijen ile yarışarak oksijen radikallerinin ve süperoksidin yapılımasını inhibe ettiği bildirilmektedir.⁵ Ayrıca MM'nin çözünebilir guanilat siklaz, nitrik oksit (NO), endotelial NO sentaz (eNOS) ve indüklenbilir NO sentaz (iNOS) inhibisyonu yaparak NO etkilerini önleyebileceği belirtilmektedir.⁶⁻⁸ Son yıllarda yayınlanan çalışmalarda MM'nin çekal ligasyon ve delme (ÇLD) metodu ile sepsis veya intestinal iskemik/ reperfüzyon hasarı oluşturulan ratlarda, alveolar hasarı önlediği ve arteriyel oksijenizasyonu artırdığı bildirilmektedir.^{9,10} Ayrıca MM'nin sepsiste gelişen hipotansiyonu, miyokard kontraktilesini ve oksijen dağılımını düzeltebileceği belirtilmektedir.¹¹

Bu çalışmada, sepsisin hiper (erken) ve hipodinamik (geç) fazlarında, akciğer dokusundaki NO üretimi, antioksidan kapasite ve lipid peroksidasyonu üzerine MM'nin etkilerinin rat sepsis modelinde araştırılması amaçlandı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız, İnönü Üniversitesi Hayvan Etik Kurulu onayı alındıktan sonra Dicle Üniversitesi Araştırma laboratuvarından alınan ağırlıkları 200-230 g arasında değişen Sprague Dawley cinsi 60 dişi ratda gerçekleştirildi. 7 gün süre ile hayvan laboratuvarında uygun koşullarda yiyecek ve içecekleri temin edilerek uyum süreci için beklendikten sonra, deneysel protokol başlatıldı. Ratlar rastgele üç gruba (n=20) ayrıldı. İlk grup kontrol grubu (grup K); 2. grup ÇLD metodu ile sepsis oluşturulan grup (grup S); 3. grup ise ÇLD ile sepsis oluşturulduktan sonra intraperitoneal (i.p.) 25mg/kg MM verilen grup (grup MMS) olarak belirlendi. Her grup kendi içinde

rastgele 10 rattan oluşan ikiye gruba ayrıldı. Ratlar, sepsisin farklı evrelerinde gelişen inflamatuvar yanıtı incelemek için, cerrahi prosedürden 9 s (erken sepsis) ve 18 s (geç sepsis) sonra sakrifiye edildi.¹² Ratlar, eter anestezisi altında, kan örneği alındıktan sonra servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi. Mikrobiyolojik kültür analizi için, periton sıvısı ve kandan, antioksidan düzeyi ölçümü ve histolojik inceleme için akciğer dokusundan örnekler alındı.

Sepsis ÇLD yöntemi ile oluşturuldu.¹³ Eter anestezisi altında abdomen traş edildi, diaframanın altından 2 cm uzunluğunda ortahat insizyon yapıldı. Çekum ortaya çıkarıldı ve barsak pasajını engellemeyecek şekilde ileoçekal valvin altından bağlandı. Daha sonra 16 G iğne ile çekuma iki adet delik açıldı. Kontaminasyon için, çekum sıkıştırılarak gaitanın deliklerden çıkması sağlandı. Barsak yerine yerleştirildikten sonra insizyon 3/0 steril ipek ile çift kat kapatıldı. Tüm ratlara cerrahi sonrasında ve postoperatif 6. saatde sıvı resüsitasyonu amacıyla 5ml/100g sırt bölgesine subkütan olarak normal salin solüsyonu (SF) verildi. Cerrahi sonrasında ratlar aç bırakıldı, fakat su alınımları kısıtlanmadı.

Cerrahi işlem tamamlandıktan hemen sonra, MMS grubundaki ratlara i.p. 25mg/kg 2cc SF içinde MM, grup K ve S'deki ratlara ise 2 cc SF verildi. Kontrol grubuna, ÇLD dışındaki tüm cerrahi işlemler uygulandı.

Biyokimyasal analizlerde kullanılacak olan dokular numaralandırılarak alüminyum folyoya sarıldı. Derin dondurucuda (-80 °C) biyokimyasal testlerin yapılacağı güne kadar muhafaza edildi.

SOD aktivitesi ölçümü: Ksantin-ksantin oksidaz sistemi ile üretilen süperoksidin nitroblue tetrazoliumun indirgenmesi esasına dayanır. Oluşan süperoksid radikalleri NBT'yi indirgeyerek renkli formazanı oluşturur. Bu kompleks 560 nm'de maksimum absorban verir.¹⁴

Glutatyon peroksidaz aktivitesi ölçümü: Ortamda bulunan GSH-Px enziminin kataliziyle Hidrojen peroksit (H₂O₂)'in H₂O ve singlet oksijene çevrilmesi ve bunun da redükte GSH'ı okside GSH'a (GSSG) çevirmesinin hızı prensibine dayanmaktadır. GSSG'nin oluşum hızı deney ortamındaki NADPH'in NADP'ye çevrilmesi ile optik dansitede meydana gelen azalmanın 340 nm'de takibiyle hesaplanır.¹⁵

KAT aktivitesi ölçümü: H₂O₂, ultraviyole spektrumu aralığında dalga boyunun azalması ile artan bir

Septik Ratlarda Metilen Mavisinin Akciğer Hasarı Üzerine Etkileri

#

absorbsiyon verir. Deney ortamında, KAT enziminin kataliziyle H_2O_2 'nin parçalanması, 240nm'de bir azalma olarak takip edilir. Absorbansta gözlenen azalma hızı enzim aktivitesi ile doğru orantılıdır.¹⁶

Malondialdehit (MDA) ölçümü: Tiyoobarbitürik asit ile 95 °C'de reaksiyona giren MDA, pembe renkli bir görünüm oluşturur. Spektrofotometrede eksitasyon 525 nm, emisyon 547 nm dalga boylarında ölçüldü.^{17,18}

Total nitrit+nitrat (NOx) ölçümü: Numuneler kadmiyum ile 2 saat süreyle muamele edildi. Numunedeki nitratın (NO_3) nitrite (NO_2) dönüşmesinden sonra Greiss reaktifi ile renklendirildi ve 545 nm'de spektrofotometrik yöntemle ölçüldü.¹⁹ Protein ölçümünde Lowry Metodu uygulandı.²⁰

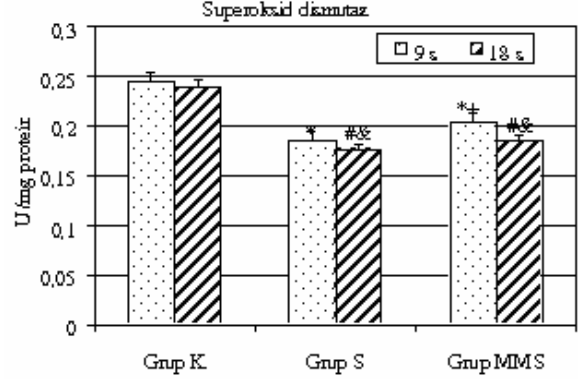
Akciğer hasarının histolojik değerlendirilmesi: %10'luk formaldehid ile sabitleştirildikten sonra akciğer ince kesitleri parafin içine gömüldü, kesit hazırlandı ve hemotoksilen eozin (HE) ile boyandı. Işık mikroskopunda incelenmeye alındı. Akciğer hasarı patolog tarafından, alveolar ve interstisyel iltihabi infiltrasyon ile septal kalınlaşma değerlendirilerek, 1 (en iyi) ve 4 (en kötü) arasında derecelendirildi.⁹

Veriler SPSS 10.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) programı kullanılarak analiz edildi. Gruplar arası karşılaştırmalar bağımsız gruplarda tek yönlü varyans analizi; grup içi, tekrarlayan ölçüm için tekrarlı ölçümlerde varyans analizi ve ardından Tukey post hoc test ile değerlendirildi. $P < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Değerler ortalama \pm standart hata ($ort \pm SH$) olarak verildi.

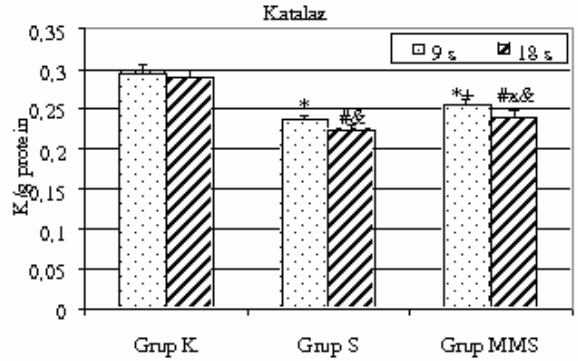
BULGULAR

Sepsis oluşturulan gruplardan alınan tüm kan kültürlerinde E.coli üredi. Grup S' de Grup K'ya göre, SOD, KAT ve GSH-PX seviyeleri hem erken hem de geç sepsis fazında anlamlı olarak düşüktü (Şekil 1,2,3). MMS grubu grup S ile karşılaştırıldığında, KAT seviyeleri her iki sepsis fazında, SOD ve GSH-PX seviyelerinin ise sadece erken sepsis fazında anlamlı olarak yükseldiği saptandı. MM, her iki sepsis fazında grup S' ye göre NOx ve MDA seviyelerini anlamlı olarak azalttı (Şekil 4 ve 5)($p < 0.05$). MM uygulanan gruplarda geç sepsis fazı erken sepsis fazı ile karşılaştırıldığında SOD, KAT ve GSH-PX seviyeleri anlamlı olarak düşüktü ($p < 0.05$).

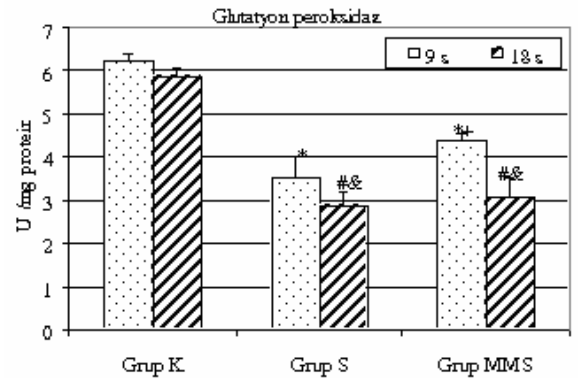
Şekil 1. Grupların süperoksit dismutaz düzeyleri. * $p < 0.05$ grup K ile karşılaştırıldığında (9. s), # $p < 0.05$ grup K ile karşılaştırıldığında (18. s), + $p < 0.05$ grup S ile karşılaştırıldığında (9. s), & $p < 0.05$ grup içi 9. s ile karşılaştırıldığında.



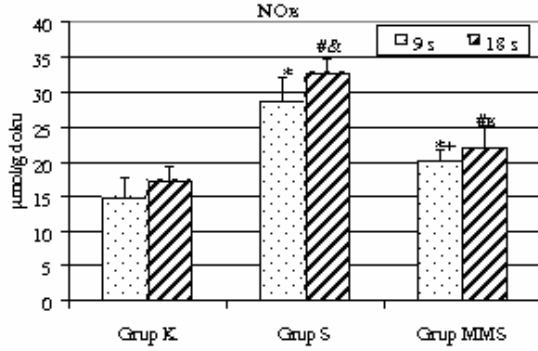
Şekil 2. Grupların katalaz düzeyleri. * $p < 0.05$ grup K ile karşılaştırıldığında (9. s), # $p < 0.05$ grup K ile karşılaştırıldığında (18. s), + $p < 0.05$ grup S ile karşılaştırıldığında (9. s), x $p < 0.05$ grup S ile karşılaştırıldığında (18. s), & $p < 0.05$ grup içi 9. s ile karşılaştırıldığında.



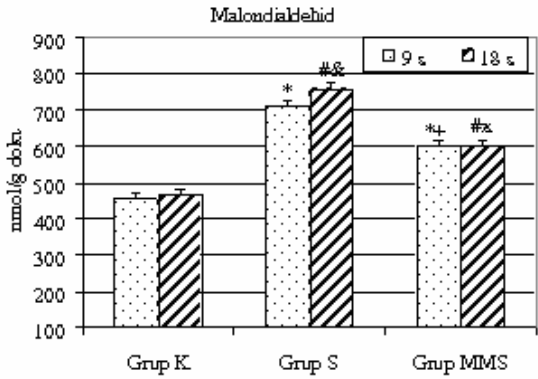
Şekil 3. Grupların glutatyon peroksidaz düzeyleri. * $p < 0.05$ grup K ile karşılaştırıldığında (9. s), # $p < 0.05$ grup K ile karşılaştırıldığında (18. s), + $p < 0.05$ grup S ile karşılaştırıldığında (9. s), & $p < 0.05$ grup içi 9. s ile karşılaştırıldığında.



Şekil 4. Grupların NOx düzeyleri. * p<0.05 grup K ile karşılaştırıldığında (9. s), # p<0.05 grup K ile karşılaştırıldığında (18. s), + p<0.05 grup S ile karşılaştırıldığında (9. s), x p<0.05 grup S ile karşılaştırıldığında (18. s), & p<0.05 grup içi 9. s ile karşılaştırıldığında.



Şekil 5. Grupların malondialdehid düzeyleri. * p<0.05 grup K ile karşılaştırıldığında (9. s), # p<0.05 grup K ile karşılaştırıldığında (18. s), + p<0.05 grup S ile karşılaştırıldığında (9. s), x p<0.05 grup S ile karşılaştırıldığında (18. s), & p<0.05 grup içi 9. s ile karşılaştırıldığında.

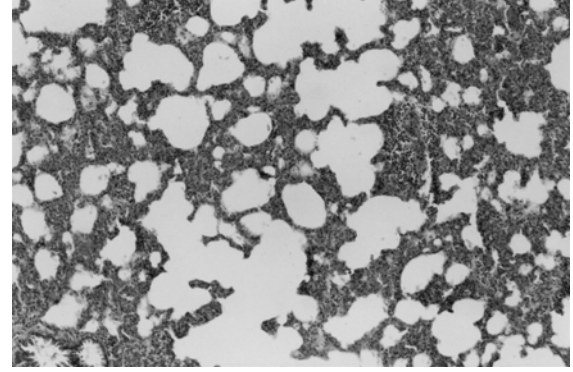


Akciğer dokusunun histopatolojik incelemesinde; Grup S'de interstisyel alanda belirgin iltihabi infiltrasyon artışı ve alveolar septalarda kalınlaşma vardı (Fotoğraf A ve C). Hem erken hem de geç sepsis fazında, alveolar hasar skoru MMS gruplarında (sırasıyla 1.7±0.21, 1.8±0.13)(Fotoğraf B ve D), sepsis gruplarına (sırasıyla 2.8±0.2; 3.1±0.23) göre daha düşüktü.

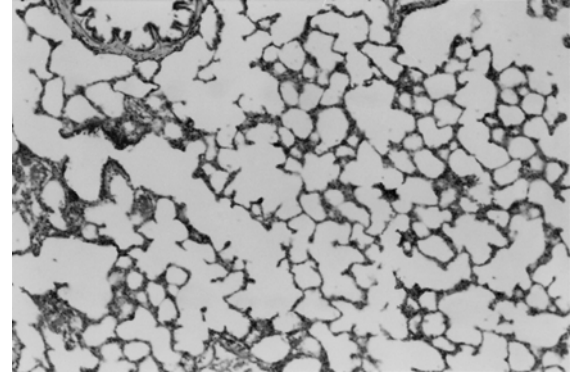
TARTIŞMA

ÇLD metodu ile hayvanlarda oluşturulan sepsisin, hiperdinamik (erken) ve hipodinamik (geç) bifazik klinik belirtileri ile insanlardaki sepsise benzediği kabul edilir. ÇLD'den sonra, hiperdinamik fazın 2-10 s, hipodinamik fazın 16-20 s sürdüğü gösterilmiştir.²¹ Bu nedenle çalışmamızda erken sepsis grubu için 9. s, geç sepsis grubu için de 18. s tercih edildi.

Fotoğraf A ve B: ÇLD'den 9 saat sonar MM'si verilen gruba göre (B), grup S'de (A) belirgin iltihabi infiltrasyon artışı ve alveolar septalarda kalınlaşma izlendi.



Fotoğraf B.



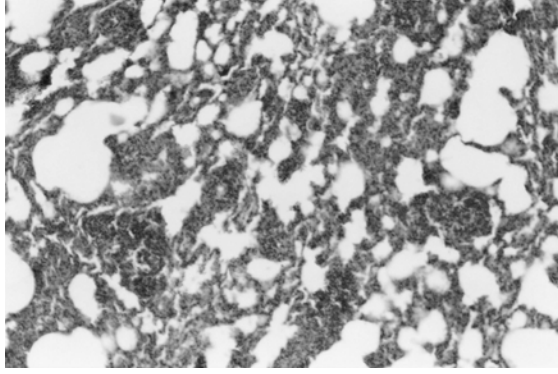
Akciğerler, özellikli yapısı ve fonksiyonu nedeniyle, inflamasyon sırasında zarar görebilecek hedef bir organdır. Oluşan reaktif oksijen ve nitrojen türleri (ROT, RNT), hem direkt hem de indirekt etkileri ile inflamatuvar hasara katkıda bulunur.¹ Pulmoner inflamasyon sırasında, iNOS'un uyarılmasıyla NO sentezi artar. NO, vasküler düz kaslarda relaksasyona ve aşırı üretildiğinde süperoksit ile reaksiyona girerek sitotoksik bir oksidan olan peroksinitrit oluşumuna neden olur.¹⁰ SOD, süperoksidi ortamdaki uzaklaştırıp NO ile reaksiyona girmesini engelleyerek peroksinitrit oluşumunu önleyen güçlü bir antioksidandır.²² KAT ve GSH-PX, hidrojen peroksidin suya dönüşümünü kataliz eder. Tüm bu antioksidanlar, serbest toksik radikallerin sitotoksik etkisini sınırlar.⁴ ARDS gelişen hastalarda, antioksidan sistemin belirgin olarak baskılandığı bildirilmiştir.³

Çalışmamızda, MM sepsisin erken fazında daha belirgin olmak üzere akciğer dokusunda antioksidan düzeyi artırırken, aşırı NO üretimini her iki sepsis fazında da azalttı. MM verilen gruplarda, geç sepsis

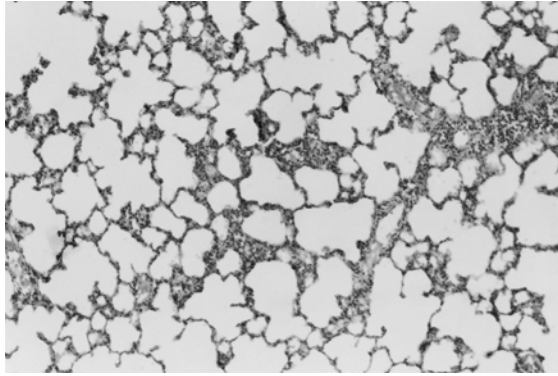
#

fazında antioksidan enzimlerin azalmaya meyilli olması etkisinin azaldığı şeklinde yorumlanabilir.

Fotoğraf C ve D: ÇLD'den 18 saat sonra, MM'si verilen gruba göre (D), gup S'de (C) izlenen belirgin iltihabi infiltrasyon artışı ve alveolar septalarda kalınlaşma devam etmekteydi.



Fotoğraf D.



Ancak, bu etkiye rağmen, lipid peroksidasyonunun göstergesi olan MDA düzeyleri her iki sepsis fazında da azaldı. Bu bulgular, MM'nin NO üretimini baskılamasının yanısıra oksidatif stresi de azaltarak akciğer hasarını önlediğini düşündürmektedir.

Galili ve ark,⁹ ÇLD metodu ile oluşturulan akciğer hasarında, MM'nin NO'ın septik şokta istenmeyen hemodinamik etkilerini önleyerek alveolar hasarı azalttığını göstermiştir.

Galili ve ark,¹⁰ intestinal iske mi/reperfüzyona bağlı akciğer hasarında yaptıkları bir diğer çalışmada ise, MM'nin interstisyel ve pulmoner ödemi azalttığı, nötrofil sekestrasyonunu önlediğini bildirmiştir. Akciğer XO düzeyinde bir farklılık bulunmaması nedeniyle bu etkinin NO aktivitesinin engellenmesine bağlı olabileceği belirtilmiştir.

Kirov ve ark,²³ endotoksin enjekte edilen koyunlarda, sadece inhale NO (INO) uygulaması ile karşılaştırıldığında MM infüzyonu ve INO kombinasyonunun, akciğer hasarından korunmada daha etkili olduğunu göstermiştir. Ayrıca, INO uygulaması kesildikten sonra yararlı etkilerin devam etmesi nedeniyle, asıl etkinin MM'ne bağlı olabileceği bildirilmiştir.

Bu çalışmalarda MM'nin, akciğer hasarı üzerine etkileri, genellikle 4 ve 8 s gibi kısa dönemde araştırılmıştır.^{9,10,23} Çalışmamızda ise sepsisin erken ve geç fazlarını da içeren uzun süreli etkileri incelendi.

Düşük moleküler ağırlıklı ve lipide çözünebilir bir ajan olan MM, hücre ve dokulara kolaylıkla penetre olur.²⁴ Uygulanma şekline bağlı olarak, farklı organlarda kandan daha yüksek seviyelerde bulunduğu saptanmıştır.²⁵ Callaway ve ark,²⁶ 10 mg/kg dozda verilen MM'nin, kandan 10 kat yüksek konsantrasyonda beyinde bulunduğunu ve 24 s sonra ise bu dozun büyük bir kısmının organlarda tutulduğunu bildirmiştir. Çalışmamızda, MM'nin akciğer dokusundaki düzeyi ölçülmedi. Ancak, MM'nin geç sepsis fazında akciğer hasarını önleyici etkisinin devam etmesi, akciğer dokusunda tutulduğunu düşündürmektedir.

MM, uzun yıllardır klinikte diagnostik girişimlerde ve methemoglobinemi tedavisinde güvenle kullanılan farmakolojik bir ajandır. Çalışmamızda MM'nin NO sentezini azaltıcı etkisinin yanısıra SOD, KAT ve GSH-Px düzeylerini arttırarak lipid peroksidasyonunu önlediği ve böylece erken sepsis fazında daha belirgin olmak üzere akciğer hasarını azalttığı saptandı. Bu sonuçlar, MM'nin sepsis seyrinde gelişebilecek olan organ disfonksiyonunun önlenmesinde yararlı olabileceğini düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

1. Lang JD, McArdle PJ, O'Reilly PJ, Matalon S. Oxidant-antioxidant balance in acute lung injury. Chest 2002; 122 (Suppl 6): 314-20.
2. Ware LB. Advances in the pathogenesis and treatment of the acute respiratory distress syndrome. Clinical Pulmonary Med 2003; 10:208-18.
3. Metzitz PGH, Bartens C, Fischer M, Fridrich P, Steltzer H, Druml W. Antioxidant status in patients with acute respiratory distress syndrome. Intensive Care Med 1999; 25: 180-5.
4. Roth E, Manhart N, Wessner B. Assessing the antioxidative status in critically ill patients. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 2004; 7:161-8.
5. Salari SC, Babbs CF, Voorhees WD. Methylene blue as an inhibitor of superoxide generation by xanthine oxidase: a potential new drug for the attenuation of ischemia/reperfusion injury. Biochem Pharmacol 1991; 42: 499-506.
6. Weinbroum A, Goldin I, Kluge Y. Methylene blue in preventing hemodynamics and metabolic derangement following superior mesenteric artery clamping/unclamping: An intratracheal vs. intraperitoneal dose response study. Shock 2002; 17: 372-6.
7. Donati A, Conti G, Loggi S, et al. Does methylene blue administration to septic shock patients affect vascular permeability and blood volume? Crit Care Med 2002; 30: 2271-7.
8. Cheng X, Pang C. Pressor and vasoconstrictor effects of methylene blue in endotoxaemic rats. Arch Pharmacol 1998; 357: 648-53.
9. Galili Y, Kluger Y, Mianski Z, Iaina A, Vollman Y, Marmur S, Soffer D, Chernikovskiy T, Klausner JP, Rabau MY. Methylene Blue- a promising treatment modality in sepsis induced by bowel perforation. Eur Surg Res 1997; 29:390-5.

Demirbilek ve ark

10. Galili Y, Ben-Abraham R, Weinbroum A, Marmur S, Iaina A, Volman Y, Peer G, Szold O, Soffer D, Klausner J, Rabau M, Kluger Y. Methylene blue prevents pulmonary injury after intestinal ischemia-reperfusion. *J Trauma* 1998; 45:222-6.
11. Kirov MY, Evgenov OV, Evgenov NV, Egorina EM, Sovershaev MA, Sveinbjornsson B, Nedashkovsky EV, Bjertnaes LJ. Infusion of methylene blue in human septic shock: A pilot, randomized, controlled study. *Crit Care Med* 2001; 29: 1860-7.
12. Hwang TL, Yang JT, Lau YT. Arginine- nitric oxide pathway in plasma membrane of rat hepatocytes during early and late sepsis. *Crit Care Med* 1999; 27: 137-41.
13. Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH. Sepsis and septic shock- a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res* 1980; 29:189-201.
14. Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988; 34: 497-500.
15. Paglia DE, Valentine W. Studies on the quantitative and qualitative characterisation of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70: 158-169.
16. Aebi HC. In Bergmeyer U, ed. *Methods of enzymatic analysis*, New York and London. Academic press, 1974; pp: 673-7.
17. Sinnuber RO, Yut C, Chang YT. Characterization of the red pigment formed in the thiobarbituric acid determination of oxidative rancidity. *Food Res* 1958; 23: 626-32.
18. Sakawa T, Matsushita S. Coloring condition of thiobarbituric acid test of detecting lipids hydroperoxides. *Lipids* 1980; 15: 137-44.
19. Granger DL, Taintor RR, Boockvar KS, Hibbs JB Jr. Measurement of nitrate and nitrite in biological samples using nitrate reductase and Griess reaction. *Meth Enzymol* 1996; 268: 142-51.
20. Lowry O, Rosenbraugh N, Farr L. Protein measurement with theophiline phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 183: 265-75.
21. Wang P, Zheng F, Irshad H. Mechanism of Hepatocellular Dysfunction During Early Sepsis. *Arch Surg* 1997; 132: 364-70.
22. Iqbal M, Cohen R, Marzouk K, Liu S. Time course of nitric oxide, peroxy nitrite and antioxidants in the endotoxemic heart. *Crit Care Med* 2002; 30: 1291-6.
23. Kirov MY, Evgenov OV, Bjertnaes LJ. Combination of intravenously infused methylene blue and inhaled nitric oxide ameliorates endotoxin-induced lung injury in awake sheep. *Crit Care Med* 2003; 31: 179-86.
24. Zhang H, Rogiers P, Preiser JC, Spapen H, Manikis P, Metz G, Vincent JL. Effects of methylene blue on oxygen availability and regional blood flow during endotoxic shock. *Crit Care Med* 1995; 23: 1711-21.
25. Peter C, Hongwan D, Kupfer A, Lauterburg B. Pharmacokinetics and organ distribution of intravenous and oral methylene blue. *Eur J Clin Pharmacol* 2000; 56: 247-50.
26. Callaway NL, Riha PD, Bruchey AK, Munshi Z, Gonzalez-Lima F. Methylene blue improves brain oxidative metabolism and memory retention in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2004; 77: 175-81.

Yazışma Adresi:

Yrd.Doç.Dr. Semra Demirbilek
İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Anesteziyoloji ve Reanimasyon AD
44315 Malatya
Tel : 422 341 0660-3136
E-posta : sedemirbilek@inonu.edu.tr